



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TOXICOLOGIA DE NANOMATERIAIS

Trabalho submetido por
Luis Miguel Ferraz Martins
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

outubro de 2015



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TOXICOLOGIA DE NANOMATERIAIS

Trabalho submetido por
Luis Miguel Ferraz Martins
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Álvaro Lopes

outubro de 2015

Dedicatória

Dedico aos meus Pais, Avós, Irmão, Namorada e ao grande Gabriel.

Agradecimentos

Quero agradecer ao meu orientador, Prof. Doutor Álvaro Lopes pela disponibilidade e orientação, assim como pelos conhecimentos transmitidos na realização desta monografia.

Às minhas colegas e amigas, Catarina, Inês, Leonor, Mariana e Sandra, obrigado pelos bons momentos que me proporcionaram, mas sobretudo pela vossa presença ao longo da minha vida académica.

À minha família, em especial aos meus pais por permitirem a concretização desta etapa da minha vida, sem eles não seria possível.

À Sofia que me fortaleceu e foi e será sempre o meu pilar e companheira desta luta que é a vida, a ela agradeço do fundo do coração por se ter cruzado no meu caminho! Amo-te Sofia.

A todos muito Obrigado!

Luis

Resumo

A Nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar que consiste na otimização das propriedades da matéria permitindo o desenvolvimento de sistemas com um tamanho na escala dos nanómetros.

As nanopartículas são partículas cujas dimensões estão entre 1 e 100 nanómetros, podem ser produzidas naturalmente pela natureza ou desenvolvidas pelo homem, e podem ser incorporadas em diferentes processos industriais, o que leva a uma grande exposição ao nível ambiental. Apresentam propriedades específicas relativamente à sua escala nanométrica, propriedades essas que variam quanto ao tamanho, composição química, forma e superfície.

Existem diversas áreas onde as nanopartículas podem ser aplicadas, tanto na área alimentar, à eletrónica, indústria farmacêutica, cosmética, biotecnologia, médico-hospitalar e agrícola.

A Nanomedicina é uma área em franca expansão e o recurso às nanotecnologias disponíveis, revela-se promissor no que respeita ao desenvolvimento de terapias convencionais.

Neste trabalho o principal objetivo é estudar e caraterizar os possíveis efeitos tóxicos das nanopartículas tanto nos seres humanos como no ambiente.

Palavras-chave

Nanotecnologia; Nanopartículas; Nanomedicina; Toxicologia; Nanotoxicologia.

Abstract

Nanotechnology is a multidisciplinary science that consists in optimizing the properties of matter allowing the development of systems with a size in the range of nanometers.

Nanoparticles are particles whose dimensions are between 1 and 100 nanometers, can be produced naturally by nature or made by man and can be incorporated in different industrial processes, which leads to a large environmental exposure level. Exhibit specific properties with respect to their nanoscale properties such that vary in size, chemical composition, shape and surface.

There are several areas where nanoparticles can be applied in both the food sector, the electronics, pharmaceutical, cosmetics, biotechnology, healthcare and agriculture.

The Nanomedicine is a booming area and the use of nanotechnology available, proves to be promising as regards the development of conventional therapies.

In this work the main objective is to study and characterize the possible toxic effects of nanoparticles in both humans and the environment.

Keywords

Nanotechnology; Nanoparticles; Nanomedicine; Toxicology; Nanotoxicology.

Índice geral

Dedicatória.....	3
Agradecimentos.....	5
Resumo	7
Abstract.....	9
Índice geral	11
Índice de figuras	13
Índice de tabelas	15
Lista de abreviaturas	17
 Introdução	 19
 Capítulo 1 - Nanopartículas e nanotecnologia.....	 23
1.1 - Aplicações dos nanomateriais	24
1.2 - Tipos de Nanopartículas	26
1.3 - Métodos de Produção	34
 Capítulo 2 - Absorção de nanopartículas	 37
2.1 - Absorção a nível celular	37
2.2 - Inalação	38
2.3 - Via oral	38
 Capítulo 3 - Nanotoxicologia	 39
3.1 - Importância do estudo da toxicologia de nanopartículas	39
3.2 - Avaliação da toxicidade de nanomateriais	41
3.3 - Efeitos das nanopartículas	44

Capítulo 4 - Exemplo de estudo de avaliação de nanotoxicidade	45
4.1 - Estudo relativo a nanopartículas de TiO ₂ e ácido fosfotúngstico.....	45
4.2 - Avaliação da toxicidade <i>in vitro</i>	45
4.3 - Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i>	49
 Conclusão	 53
 Bibliografia.....	 55

Índice de figuras

Figura 1 - Físico Richard Phillips Feynman	20
Figura 2 - Cientista Norio Taniguchi.....	20
Figura 3 - Heinrich Rohrer e Gerd Binnig.....	21
Figura 4 - Robert Curl, Harold Kroto e Richard Smalley.	21
Figura 5 - Eric Drexler Kim.	22
Figura 6 - Escala nanométrica	23
Figura 7 - Áreas de aplicação dos nanomateriais.	24
Figura 8 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas	26
Figura 9 - Estrutura esquemática de micela e lipossoma: a) Micela; b) Lipossomas.....	28
Figura 10 - Estrutura esquemática de uma Nanoemulsão e de uma NLS: a) Nanoemulsão; b) NLS.	29
Figura 11 - 1.Espectro de Fotoluminescência de Quantum dots em relação ao comprimento de onda de emissão; 2.Quantum dots em forma de pó; 3. Tamanho, em nm, na relação entre a cor e o comprimento de onda de emissão.....	31
Figura 12 - 1. SWNTs; 2. MWNTs	32
Figura 13 - “Esfera” de Fulureno	33
Figura 14 - Técnica <i>Bottom-up</i>	34
Figura 15 - Técnica <i>Top-Down</i>	34
Figura 16 - Evolução do número de publicações científicas envolvendo toxicidade de nanomateriais e nanopartículas indexadas no banco de dados do ISI Web of Knowledge.	40
Figura 17 - Corpo humano e as vias de exposição às nanopartículas, órgãos afetados pelas mesmas, e doenças associadas a partir de estudos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	44
Figura 18 - Citotoxicidade de nanopartículas de TiO ₂ em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B) pelo método MTT. As células foram incubadas com concentrações de 0 a 500 µg/mL de nanopartículas, por 24 horas..	46
Figura 19 - Citotoxicidade do HPW em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B) pelo método MTT. As células foram incubadas com concentrações de 0 a 1000 µg/mL do ácido, durante 24 horas.....	47

Figura 20 - Efeito das nanopartículas de TiO ₂ e do HPW na produção de EROs em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B). Foi determinado através da sonda DCFH-DA, conforme descrito anteriormente. As células foram incubadas com 500 µg/mL das nanopartículas e 1000 µg/mL das nanopartículas e 1000 µg/mL de HPW durante 24 horas	48
Figura 21 - Nanopartículas de TiO ₂ acumuladas perto do fígado e estômago.....	49

Índice de tabelas

Tabela 1- Possíveis efeitos fisiopatológicos de nanopartículas	42
Tabela 2 - Variação do peso corporal após tratamento com nanopartículas de TiO ₂	49
Tabela 3 - Peso dos órgãos dos animais	50
Tabela 4 - Parâmetros hematológicos dos animais.....	51
Tabela 5 - Parâmetros bioquímicos dos animais	52

Lista de abreviaturas

ALT - Alanina aminotransferase

AST - Aspartato aminotransferase

CdS - Sulfeto de cádmio

CdSe - Seleneto de cádmio

EROs - Espécies reativas de oxigênio

HPW - Ácido fosfotúngstico

MDCK - Linhagem de fibroblasto canino

MTT - Método que avalia a actividade metabólica das células quantificando a redução metabólica

MWNTs - Multi-wall carbon nanotubes

NLC - Transportadores lipídicos nanoestruturados

NLS - Nanopartículas de lípidos sólidos

nm - Nanómetro

N&N - Nanociência e Nanotecnologia

SWNTs - Single-wall carbon nanotubes

TiO₂ - Dióxido de titânio

ZnO - Óxido de zinco

ZnS - Sulfato de zinco

µm - Micrómetro

Introdução

A Nanociência, consiste no estudo das propriedades de estruturas, dispositivos e materiais normalmente com dimensões entre 0,1 e 100nm (Delgado & Paumgartten, 2013), com crescentes repercussões – Nanotecnologia - em diferentes sectores, desde a área alimentar, à eletrónica, indústria farmacêutica, cosmética, biotecnologia, médico-hospitalar e agrícola (Federici, Shaw, & Handy, 2007; Moore, 2006; Smith, Shaw, & Handy, 2007; D. Wang, Du, & Zheng, 2008).

O prefixo “nano” deriva do grego “nannos”, que significa anão, em que um nanómetro equivale a um bilionésimo de metro.

A nanotecnologia é um dos ramos mais falados e em desenvolvimento da atualidade, devido aos grandes investimentos e às expectativas de aplicabilidade. Os maiores contribuidores têm sido os Estados Unidos, seguidos da Alemanha e do Japão. De realçar que tem sido escasso o investimento no que diz respeito ao estudo da toxicidade dos mesmos, citando-se como exemplo, os Estados Unidos, que do total que investiu em Nanociência e Nanotecnologia (N&N), apenas 3% foi destinado à avaliação dos possíveis riscos associados. (Davies, 2007) Por outro lado, a União Europeia investiu bastante nos últimos anos relativamente à avaliação da toxicidade de nanomateriais e possíveis riscos associados (Paschoalino, Marcone, & Jardim, 2010).

A nanotecnologia surgiu numa palestra intitulada “There’s plenty of room at the bottom”, orientada por Richard Phillips Feynman (Figura 1) no Instituto de Tecnologia da Califórnia a 29 de dezembro de 1959. Feynman, intitulado como o pai da nanotecnologia, físico e Prémio Nobel em 1965, tinha como objectivo o desenvolvimento de novas tecnologias que operassem na menor escala possível, “estruturando objectos átomo por átomo” (Rajabi, Ramazani, Hamidi, & Naji, 2015).

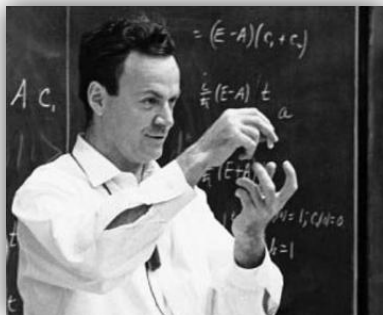


Figura 1 - Físico Richard Phillips Feynman (retirada de: <http://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>).

No entanto o termo nanotecnologia foi citado pela primeira vez numa conferência sobre semicondutores em 1974 por um cientista japonês de seu nome, Norio Taniguchi (Figura 2), que definiu nanotecnologia como “o processamento, separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou uma molécula” (Service, 2004).



Figura 2 - Cientista Norio Taniguchi (retirada de: <http://www.technoindiauniversity.ac.in>).

A evolução da Nanotecnologia foi muito devida à invenção do microscópio de varrimento em túnel em 1981 por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer (Figura 3), em que observaram pela primeira vez átomos individuais. Descoberta esta que foi galardoada com Prémio Nobel da Física em 1986 (Stroscio & Kaiser, 1993).

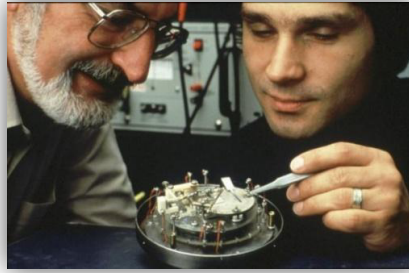


Figura 3 - Heinrich Rohrer e Gerd Binnig (retirada de: <http://www.ntmdt.com/spm-principles/view/stm-techniques>).

Outro marco determinante foi a descoberta dos fulerenos (forma alotrópica do Carbono) em 1985 por Harry Kroto, Richard Smalley e Robert Curl (Figura 4) que lhes valeu o Prémio Nobel da Química em 1996 (Curl, Smalley, & Fuller, 1996).



Figura 4 - Robert Curl, Harold Kroto e Richard Smalley (retirada de: <http://cryogenic.physics.by/index.php/en/scientific-activities/useful/299-nanotechnology-history>).

Posteriormente, o termo nanotecnologia foi desenvolvido com a publicação de vários artigos e um livro (“Engines of creation – The coming era of nanotechnology”) por Eric Drexler Kim (Figura 5) em 1986 (Whatmore, 2006).

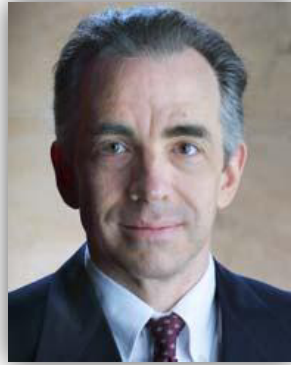


Figura 5 - Eric Drexler Kim (retirada de: <http://www.nndb.com/people/577/000023508/>).

Capítulo 1 - Nanopartículas e nanotecnologia

As Nanopartículas são partículas nas quais um ou mais componentes apresentam pelo menos uma das suas dimensões dentro do intervalo de 1 nanómetro a 1 micrómetro (Figura 6) (Fattal & Vouthier, 2002; Huertas, Mora, & Obtention, 2011). As nanopartículas fazem com que os fármacos incidam precisamente nos tecidos alvo, e além disso ainda os protegem de degradação química e/ou enzimática e diminuem os efeitos indesejáveis dos mesmos (Fattal & Vouthier, 2002).

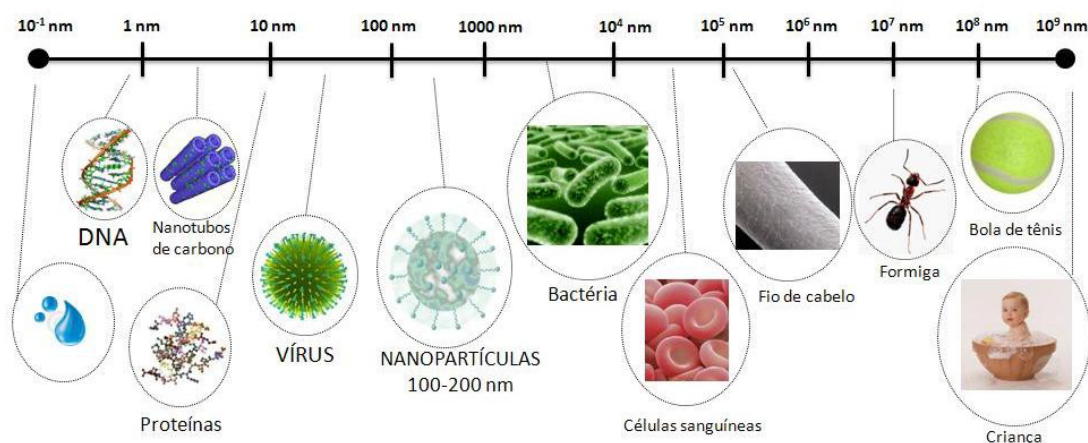


Figura 6 - Escala nanométrica (retirada de: <http://topempreendedoras.com/futuro-empendedor-1a-parte/#gallery/0/>).

Dependendo do tipo de órgão, o tamanho das nanopartículas e outros aspectos têm de se ter em consideração. Os fármacos podem ser absorvidos à superfície das nanopartículas, encapsulados ou dissolvidos na sua matriz. As características da superfície vão influenciar a interação com o meio. As principais características são a carga, hidrofília, conformação e composição química (Kolishetti et al., 2010; Ranganathan et al., 2012; Yin et al., 2012).

1.1 - Aplicações dos nanomateriais

Existem imensas aplicações relacionadas com a utilização de nanomateriais (Figura 7).



Figura 7 – Áreas de aplicação dos nanomateriais (retirada de: <http://nanotecnologiananotecnologia.blogspot.pt/>).

Um dos vários exemplos onde se aplicam nanomateriais é a aplicação de nanopartículas de TiO_2 e ZnO em protetores solares, isto fazendo refletir a radiação UV mas são transparentes no visível. (Aruoja, Dubourguier, Kasemets, & Kahru, 2009) Outros exemplos são os nanotubos de carbono em compósitos de matriz polimérica para controlar a condutividade eléctrica (Smith et al., 2007).

A curto prazo, têm sido desenvolvidos e estão em estudo aplicações de nanopartículas na formulação de tintas avançadas, na remediação de solos contaminados, em combustíveis, em baterias, como aditivos no combustível e em catalisadores.. Este tipo de aplicações levanta contudo preocupações sobre o impacto que as mesmas possam vir a ter no ambiente e na saúde.

Recentemente, tem-se assistido a um grande crescimento no que diz respeito à pesquisa e potenciais aplicações da nanotecnologia na medicina, incluindo a libertação e vectorização de produtos farmacêuticos (Fadeel & Garcia-Bennett, 2010) e aplicações no que diz respeito a imagens médicas. A associação de princípios ativos com atividade farmacológica conhecida a sistemas que permitam a alteração e adaptação das suas propriedades físico-químicas sem alterar o mecanismo de ação pode ser uma alternativa para o tratamento de muitas doenças. Hoje em dia, o grande interesse reflete-se sobre a libertação do fármaco em áreas específicas do organismo, alcançando assim um bom índice terapêutico. Além desses benefícios, também podem proteger o fármaco da degradação enzimática, química ou imunológica.

O uso de nanopartículas como sistemas de libertação e vectorização de substâncias activas possui muitas vantagens, como boa estabilidade, alta capacidade de transporte, capacidade de incorporar substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas, e a compatibilidade com diferentes vias de administração (L. H. Silva et al., 2014).

As nanopartículas também podem ser usadas para permitir a libertação do fármaco de maneira controlada e em alvos específicos. As nanopartículas também têm sido utilizadas em pesquisas biológicas na detecção de biomoléculas em ensaios de DNA, imunoensaios, entre outros (Liu & Lu, 2005).

Actualmente existe um grande foco na aplicação da nanotecnologia no tratamento do cancro. Diferentes sistemas têm sido utilizados no diagnóstico e na terapia do cancro, como por exemplo, as nanopartículas inorgânicas (nanopartículas de ouro), nanopartículas polimérica, nanopartículas lipídicas, nanotubos de carbono, pontos quânticos, entre outros.

Nos últimos anos, surgiu uma inovação na área da terapia do cancro, denominada terapia dirigida ou direccionada, que envolve o desenvolvimento de fármacos confinados a nanopartículas que pode ser em modo ativo ou passivo. O passivo é baseado na reduzida dimensão das nanopartículas, que as leva a libertar o fármaco, no local do tumor. Por outro lado, o direccionamento ativo envolve a conjugação das nanopartículas com ligandos, que se ligam especificamente a certos tipos de células tumorais, o que permite às nanopartículas distribuírem o fármaco apenas nas células tumorais e não nas restantes do organismo (Grobmyer et al., 2011).

1.2 - Tipos de Nanopartículas

1.2.1 - Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são sistemas coloidais poliméricos com tamanho entre 10 e 1000nm, onde o fármaco se pode encontrar dissolvido, revestido, encapsulado ou disperso. Dividem-se em duas categorias, as nanoesferas e as nanocápsulas (Figura 8). O fármaco encontra-se no interior de uma cavidade aquosa ou oleosa, onde essa é revestida por uma membrana polimérica (S. Melo, Cunha, & Fialho, 2012).

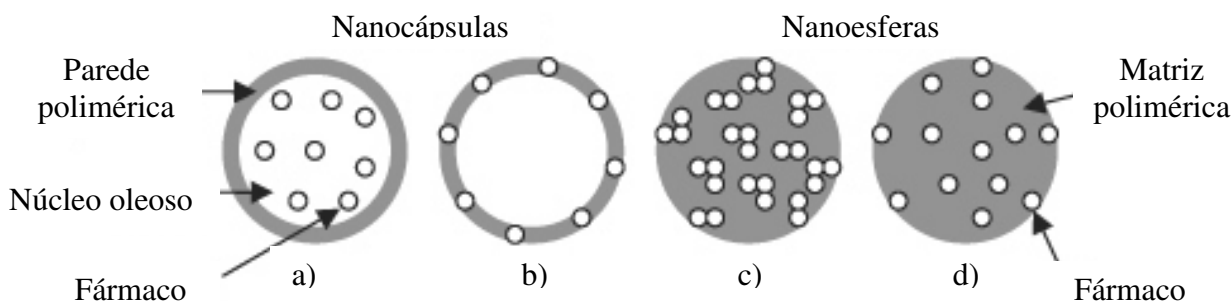


Figura 8 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas; c) fármaco retido na matriz polimérica das nanoesferas; d) fármaco adsorvido ou disperso molecularmente na matriz polimérica das nanoesferas (adaptada de: <http://www.scielo.br/img/revistas/qn/v26n5/17209f1.gif>).

A nanocápsula é um sistema vesicular onde o fármaco a encapsular está no núcleo líquido ou sólido delimitado por uma membrana polimérica, o involucro. O fármaco pode estar dissolvido, suspenso ou adsorvido no núcleo à superfície das nanopartículas (Reis, 2011; Schaffazick & Pohlmann, 2002). A nanoesfera é um sistema com estrutura tipo matriz em que os fármacos podem ser adsorvidos à superfície ou encapsulados no seu interior homogeneamente ou heterogenicamente (Reis, 2011).

1.2.2 - Dendrímeros

É uma macromolécula polimérica à nano escala, composta por múltiplas unidades funcionais ramificadas, que emergem radialmente a partir de um núcleo central (Figura 10) (Montanari & Alberto, 1998). O tamanho, funcionalidade das suas ramificações e densidade de superfície faz dos dendrímeros plataformas de transporte ideais para aplicação clínica. Muitos fármacos de tamanho molecular reduzido, com actividade anti-cancerígena, anti-inflamatória e antimicrobiana têm sido conjugados com êxito através de interações físicas ou de ligações químicas (Svenson, 2009).

Apresentam uma superfície facilmente modificável e assim ainda os torna mais polivalentes, podendo, simultaneamente, ser conjugados com ligandos e fármacos (Bharali et al., 2009; Cho, Wang, Nie, Chen, & Shin, 2008; Raj, Jose, Sumod, & Sabitha, 2012).

1.2.3 - Nanopartículas Lipídicas

As nanopartículas lipídicas podem apresentar-se em pelo menos três tipos:

- a) Lipossomas;
- b) Micelas;
- c) Nanopartículas lipídicas sólidas.

1.2.3. a) Lipossomas

Compostas por uma ou mais bicamadas lipídicas, separadas por um meio aquoso. Podem encapsular substancias hidrofílicas, que ficam no compartimento aquoso e/ou lipofílicas, que são inseridas ou adsorvidas na membrana. São bastante interessantes para pesquisa e terapêutica devido a serem biodegradáveis, biocompatíveis e não imunogénicos (Edwards & Baeumner, 2006; Raj et al., 2012).

Os lipossomas podem conter uma única bicamada lipídica ou bicamadas múltiplas em roda do compartimento aquoso interno, e assim, são classificadas em unilamelares e multilamelares (Figura 8) (Batista, Carvalho, & Magalhães, 2007; Bharali et al., 2009).

1.2.3. b) Micelas

São um conjunto de moléculas de surfactante, quando em contacto com meio aquoso agregam-se de forma espontânea, obtendo forma de vesículas esféricas. O núcleo é hidrofóbico e assim tem a capacidade de encapsular fármacos hidrófobos (Husseini & Pitt, 2008). O tamanho molecular do agente surfactante, assim como as propriedades físico-químicas vão determinar o tamanho da micela obtida (Figura 9).

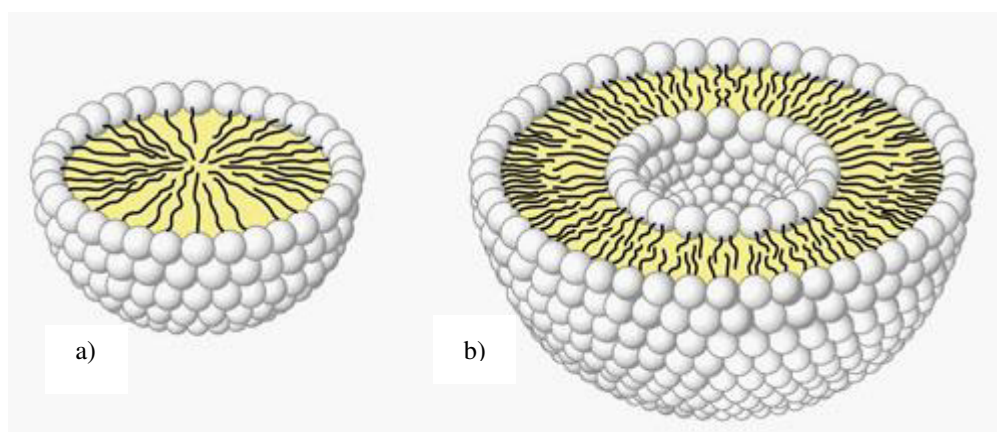


Figura 9 - Estrutura esquemática de micela e lipossoma: a) Micela; b) Lipossomas (adaptada de: <http://www.asturnatura.com/articulos/lipidos/bicapas.jpg>).

1.2.3. c) Nanopartículas lipídicas sólidas

São sistemas de libertação de fármacos compostos, em que a matriz é formada por lípidos sólidos. A estrutura é bastante parecida à das nanoemulsões, em que estas são dispersões de gotas de um líquido noutro (Mason, Wilking, Meleson, Chang, & Graves, 2006) (Figura 10), mas o seu núcleo é formado por lípidos sólidos à temperatura ambiente e não por óleos líquidos, como nas nanoemulsões. Esta solidez confere uma menor mobilidade aos ativos neles incorporados podendo controlar a velocidade de libertação destas substâncias (Chan, Valencia, Zhang, Langer, & Farokhzad, 2010; Kanlayavattanukul & Lourith, 2011; Souto, Severino, Santana, & Pinho, 2011).

De acordo com a composição da matriz lipídica, as nanopartículas lipídicas podem ser distinguidas em nanopartículas de lípidos sólidos (NLS) e transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC). Os NLC foram desenvolvidos com o objectivo de

aumentar a capacidade de carga do fármaco das NLS, recorrendo à mistura de lípidos sólidos com pequenas quantidades de óleos durante a sua formulação (Bleve, Pavanetto, & Perugini, 2011; Martinho, Damgé, & Reis, 2011; Souto et al., 2011).

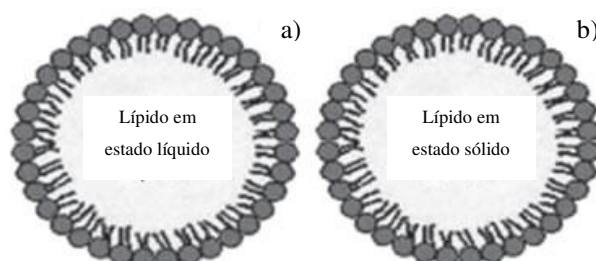


Figura 10 - Estrutura esquemática de uma Nanoemulsão e de uma NLS: a) Nanoemulsão; b) NLS (adaptada de: http://www.scielo.br/img/revistas/bjft/2012nahead/aop_0711f01.jpg).

1.2.4 - Nanopartículas proteicas

As nanopartículas proteicas têm um papel fundamental na veiculação de fármacos. Grande parte deste tipo de nanopartículas tem como início na sua formulação albumina de soro humano e bovino, gelatina e proteínas de origem vegetal (Cedervall et al., 2007; Jahanshahi & Babaei, 2008).

As proteínas são uma classe de moléculas de origem natural com funcionalidades únicas e com uma grande extensão no que diz respeito a aplicação, tanto a nível biológico como material. São biodegradáveis, não antigénicas, metabolizáveis e são facilmente adaptáveis, modificando a sua superfície, em conjugação com ligandos e fármacos (Cedervall et al., 2007; Weber, Coester, Kreuter, & Langer, 2000).

1.2.5 - Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas são coloides metálicos, especialmente as nanopartículas de Ouro e de Prata, são mais estáveis, demonstrando propriedades importantes com aplicações em várias áreas, entre elas, marcadores biológicos (Kanlayavattanakul & Lourith, 2011; Pan et al., 2007). Entre as propriedades importantes das mesmas, temos as propriedades ópticas, eletrônicas e magnéticas (Duncan & Gaspar, 2011; Kanlayavattanakul & Lourith, 2011).

1.2.5.1 - Nanopartículas de Ouro

Entre as nanopartículas metálicas, as nanopartículas de ouro estão entre as mais estudadas devido ao grande número de métodos disponíveis para a sua preparação com tamanhos uniformes e de forma bem definida (Kanlayavattanakul & Lourith, 2011; M. A. Melo, Santos, Do Carmo Gonçalves, & Nogueira, 2012; Pan et al., 2007).

A aplicação mais frequente das nanopartículas de ouro é a nível da terapia do cancro, isto devido a estas possuírem a capacidade de reter energia e transformá-la em calor, causando assim uma supressão das células tumorais, com a destruição das membranas celulares (Tong et al., 2007).

Dentro das nanopartículas de ouro temos vários tipos, entre eles, os de 1ª geração e os de 2ª geração. A diferença está em que os de 2ª geração possuem uma dimensão consideravelmente inferior, o que faz com que haja uma vantagem no que diz respeito à distribuição de fármacos (M. A. Melo et al., 2012).

1.2.5.2 - Nanopartículas de Prata

As nanopartículas de prata caracterizam-se pela sua estabilidade química, actividade catalítica e um comportamento óptico não linear. Estas propriedades conferem um grande potencial relativamente em tintas, microeletrónica e imagiologia médica. Mas o que lhes confere grande popularidade e interesse é o largo espectro de actividade antimicrobiana da prata e o custo relativamente baixo de obtenção de nanopartículas de prata (Bhol & Schechter, 2007; M. A. Melo et al., 2012).

1.2.6 - Nanopartículas semicondutoras

As nanopartículas semicondutoras também conhecidos por *Quantum dots*, ou pontos quânticos, são nanocristais com tamanho compreendido entre 1 a 100nm e que têm grande uso em imagiologia e no diagnóstico oncológico (Choi et al., 2010; Grieve, Mulvaney, & Grieser, 2000). Têm vantagens como um aumento na detecção e controle experimental comparado a outras nanopartículas (Grieve et al., 2000; Kanlayavattanakul & Lourith, 2011).

São compostas normalmente a partir de seleneto de cádmio (CdSe) revestidas por sulfato de zinco (ZnS) ou sulfeto de cádmio (CdS), isto para proteção contra oxidações e para melhorar o rendimento de fluorescência (X. Chen & Dobson, 2012; Klostranec & Chan, 2006).

Apresentam propriedades de grande interesse como sejam a capacidade de ajustar a cor de fluorescência emitida através da variação da sua composição, tamanho, forma, solvente e a sua estabilidade contra a fotodegradação (Figura 11) (Duncan & Gaspar, 2011).

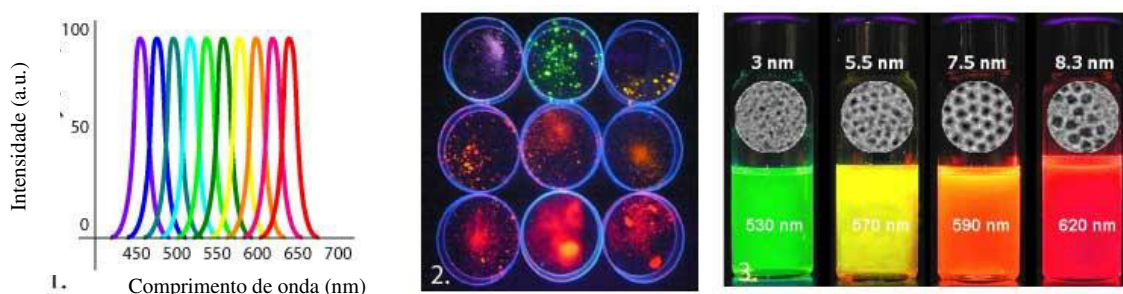


Figura 11 - 1. Espectro de Fotoluminescência de Quantum dots em relação ao comprimento de onda de emissão; 2. Quantum dots em forma de pó; 3. Tamanho, em nm, na relação entre a cor e o comprimento de onda de emissão. (adaptada de: <https://www.oceannanotech.com/nav.php?qid=5>).

1.2.7 - Nanopartículas Cerâmicas

Tem havido um notável desenvolvimento em relação às nanopartículas de cerâmica, mais precisamente no sector de libertação de fármacos (Moreno-Vega, Gómez-Quintero, Nuñez-Anita, Acosta-Torres, & Castaño, 2012). As suas propriedades são significativamente melhoradas recorrendo a pós de cerâmica que permitem uma distribuição regular de partículas no que diz respeito ao tamanho, elevada pureza química e cristalinidade (Biroi, Rambo, Guiotoku, & Hotza, 2013).

São utilizadas como sistemas de suporte de enzimas e anticorpos para imunoensaios, podem ainda ser conjugadas com partículas metálicas e com *Quantum Dots* e fulrenos em que posteriormente são aplicadas em diversos ramos da medicina (Vollath, Szabó, & Haubelt, 1997). Devido à sílica ser mesoporosa, pode ser sintetizada em diferentes tamanhos e formas, e, possuir uma grande área de superfície e estrutura de poros (Giri, Trewyn, & Lin, 2007).

1.2.8 - Nanotubos de Carbono

Os nanotubos de carbono, que são materiais de grande interesse no mundo da nanotecnologia, podem ser metais ou semicondutores, isto dependendo das características geométricas (De Souza Filho & Fagan, 2007; Kanlayavattanakul & Lourith, 2011). Quanto ao número de camadas, podem ser classificados de duas formas: nanotubos multicamadas (“multi-wall carbon nanotubes – MWNTs”) e de camada simples (“single-wall carbon nanotubes – SWNTs”) (Figura 12) (Duncan & Gaspar, 2011; Kanlayavattanakul & Lourith, 2011).

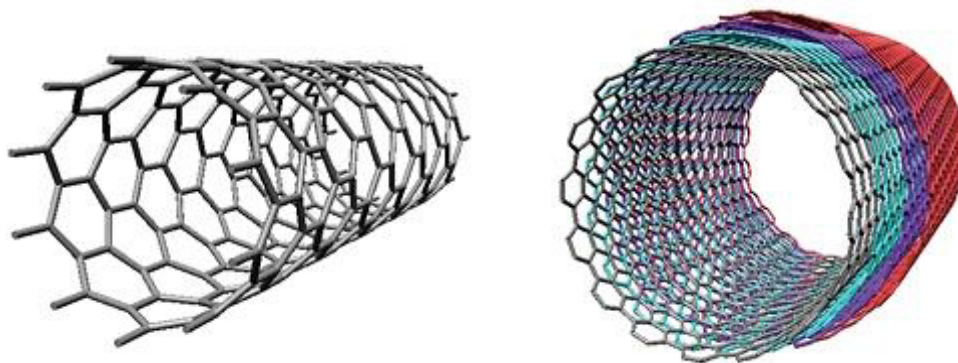


Figura 12 - 1. SWNTs; 2. MWNTs. (retirada de: <https://uwaterloo.ca/foldvari-group/research-program/drug-delivery>).

Os nanotubos de carbono apresentam propriedades eletrônicas, ópticas e mecânicas interessantes. Devido a isso, estes materiais têm sido usados no fabrico de vários tipos de dispositivos, como sensores de gases, sensores biológicos, entre outros (C. Li & Chou, 2003).

São insolúveis em todos os solventes, mas a sua superfície pode ser modificada quimicamente, para os tornar solúveis em água e, conseqüentemente, no sangue, com o objetivo de poderem ser conjugados a moléculas ativas como péptidos, proteínas, ácidos nucleicos e outros agentes terapêuticos (Tanaka et al., 2008).

1.2.9 - Fulurenos

Os fulurenos são moléculas constituídas por uma rede formada por pentágonos e hexágonos, fechando assim uma “esfera”. Devido à sua forma tridimensional, às suas ligações insaturadas e à sua estrutura, os fulurenos apresentam propriedades físicas e químicas únicas, que podem ser exploradas em uma grande variedade de áreas (Figura 13) (Santos, Rocha, Alves, & Freitas, 2010).



Figura 13 - “Esfera” de Fulureno (adaptada de:
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000300036).

1.3 - Métodos de Produção

O mais importante na produção de nanomateriais, para além do tamanho das partículas e das estruturas, é a alteração das propriedades do mesmo material de modo a atingir a escala pretendida. Quanto mais se diminui o tamanho das partículas, maior vai ser a relação entre a área superficial e o volume aumentando o efeito de superfície (Fraser, Dougill, Mabee, Reed, & McAlpine, 2006).

Na produção de nanomateriais existem duas técnicas básicas, a técnica *Bottom-up* (Figura 14) e a técnica *Top-Down* (Figura 15).

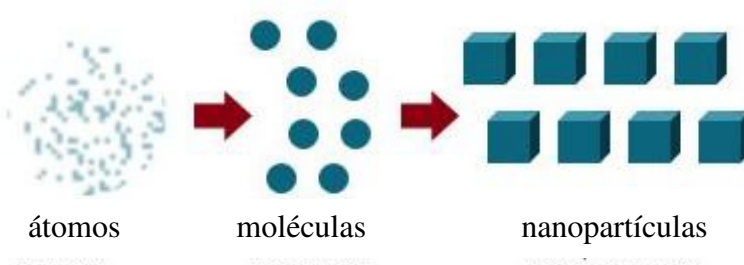


Figura 14 - Técnica *Bottom-up* (adaptada de: http://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/20160/historia_bottom3.html).



Figura 15 - Técnica *Top-Down* (adaptada de: http://www.maxwell.vrac.puc-rio.br/20160/historia_bottom2.html).

Na técnica *Bottom-up* começa-se pelos componentes à escala atômica e molecular, e a partir desses forma-se o sistema em estruturas ordenadas. Esta técnica requer menos material, tem menos perdas em relação à produção com o método *Top-down*, mas é mais demorada (Fraser et al., 2006).

Por outro lado a técnica *Top-down* parte-se de materiais de grandes dimensões, que vai sendo reduzido progressivamente até à escala manométrica desejada. Esta técnica requer mais material e, pode levar a mais desperdícios (Fraser et al., 2006).

Capítulo 2 - Absorção de nanopartículas

Os nanomateriais podem ter origem natural, como é o exemplo das poeiras vulcânicas que viajam grandes distâncias através do ar, e de alguns vírus, ou podem ter origem antropogénica, produzidos por actividades humanas, como por exemplo, o fumo do tabaco, motores, confecção de alimentos, entre outros (Louro, Borges, & Silva, 2013).

A exposição às nanopartículas pode ocorrer a vários níveis, através da absorção a nível celular, por exposição local, isto relativamente à pele, por inalação, por via oral, entre outras.

2.1 - Absorção a nível celular

As nanopartículas ao atingirem as células podem ser absorvidas pela membrana celular por diversos processos, como por exemplo a endocitose, que consiste na invaginação da parede celular sobre a partícula até esta a englobar na totalidade (Auffan et al., 2006). Por outro lado, a via transdérmica é importante quando se trata da utilização de produtos cosméticos ou de higiene pessoal que neles contenham nanomateriais (Louro et al., 2013).

Outro processo existente consiste na entrada de partículas através de organelos, pertencentes ao grupo de lípidos especializados em transportar partículas (Shin & Abraham, 2001).

É preciso ter atenção à pele lesada devido a representar uma fácil entrada para nanopartículas. Após a absorção e posteriormente no interior do organismo, as nanopartículas, devido à sua pequena dimensão, têm a capacidade de se inserirem no sistema circulatório e linfático, podendo mesmo atingir órgãos e tecidos, como por exemplo o cérebro (Buzea et al., 2007).

2.2 - Inalação

Uma das formas de exposição com maior risco de contaminação para os organismos é a inalação. Relatado em estudos realizados em roedores, humanos e com cultura de células pulmonares, mostrou-se que havia algum efeito tóxico, como casos de inflamação pulmonar, asma, obstrução crónica pulmonar e até mesmo morte (Sayes, Reed, & Warheit, 2007).

Dependendo do tamanho das partículas, estas podem alojar-se em diferentes regiões do trato respiratório, por exemplo, 90% das nanopartículas de 1nm de diâmetro depositam-se na região da nasofaringe, enquanto apenas 10% dessas nanopartículas são depositadas na região traqueobrônquica e quase nenhuma alcança a região alveolar (Forbe, García, & Gonzalez, 2011; Moghimi, Hunter, & Murray, 2005).

Depois de estarem depositadas nos pulmões, as nanopartículas podem instalar-se em zonas fora dos pulmões, atingindo outros órgãos por vários mecanismos. Um exemplo de um mecanismo é a transcitose, através do epitélio do trato respiratório, levando as partículas até à corrente sanguínea, ou mesmo sendo transportada por linfócitos, resultando na distribuição de nanopartículas por todo o corpo (Oberdörster et al., 2005).

Um estudo mais direccionado para a saúde ocupacional nas indústrias que produzam nanopartículas e laboratórios, demonstrou que o risco de exposição à inalação de nanopartículas é elevado, sendo assim obrigatório recorrer ao controlo rigoroso da qualidade do ar durante os procedimentos de produção, análise, síntese e até ao embalamento (Hund-Rinke & Simon, 2006).

2.3 - Via oral

A presença de nanomateriais em alimentos, suplementos alimentares e mesmo nas embalagens alimentares, podem criar através da absorção do intestino eventuais efeitos sistémicos que ocorrem após exposição oral devido às nanopartículas se distribuírem para os rins, fígado, baço, pulmões, cérebro e trato gastrointestinal (Forbe et al., 2011; Louro et al., 2013).

Capítulo 3 - Nanotoxicologia

3.1 - Importância do estudo da toxicologia de nanopartículas

A importância em relação ao estudo das nanopartículas, está principalmente no fato de que estas nunca foram antes produzidas e tão utilizadas em larga escala em produtos comerciais. Como tal têm uma maior probabilidade de ficarem disponíveis no ambiente, águas e solo (Paschoalino et al., 2010).

A toxicologia pode ser definida como a ciência que estuda os efeitos adversos de agentes de natureza física, química ou biológica sobre os biosistemas, tendo como objectivo o tratamento, diagnóstico e, principalmente, a prevenção. A toxicidade das nanopartículas, ou seja, a nanotoxicologia depende do seu próprio tamanho, isto porque essa variedade de tamanho faz com que as propriedades físico-químicas mudem, aumentando a capacidade de interagirem com organismos, mas isto pode resultar em efeitos adversos nas células vivas.

O estudo da nanotoxicidade é pois extremamente importante e surge na medida em que vários nanomateriais são sintetizados, manipulados e descartados em vários ambientes, sejam eles naturais, urbanos ou industriais, sem a devida legislação e controlo. A crescente produção industrial, que faz com que haja um aumento de risco de exposição, a elevada área superficial devido ao tamanho nanométrico, a grande diversidade e devido aos ensaios toxicológicos tradicionais não serem adaptados e específicos para nanomateriais, tudo isto são motivos para haver preocupação com os nanomateriais.

Tem vindo a haver uma evolução no que diz respeito ao estudo relativo à toxicidade das nanopartículas e nanomateriais. (Figura 16)

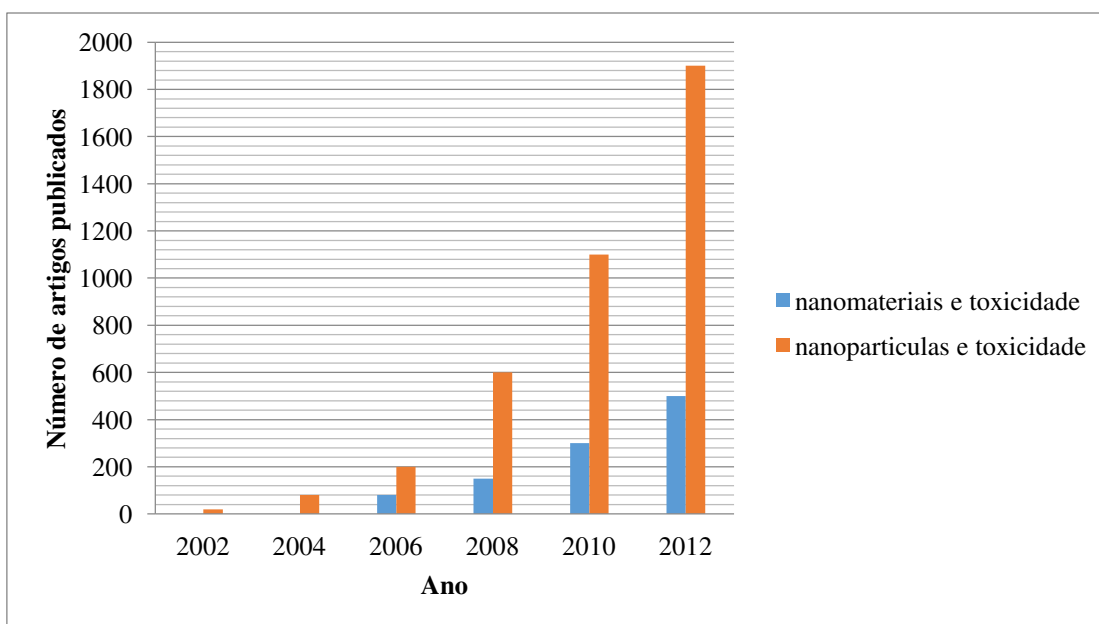


Figura 16 - Evolução do número de publicações científicas envolvendo toxicidade de nanomateriais e nanopartículas indexadas no banco de dados do ISI Web of Knowledge (Adaptada de: Johnston et al., 2013).

Um dos tópicos relacionados com a nanotecnologia é o “nanoambiente”, onde se utilizam tecnologias para combater vários problemas relacionados com o meio ambiente, tendo em vista o desenvolvimento de processos e dispositivos para se controlar a poluição, tratamento de resíduos e gestão ambiental, bem como estudos de toxicidade e bioacumulação para avaliar os riscos associados às nanotecnologias (Elsaesser & Howard, 2012; Lewinski, Colvin, & Drezek, 2008).

Assim, verificam-se duas vertentes no que diz respeito às nanotecnologias: uma verdadeiramente positiva, devido a poder fornecer alternativas únicas para combater a poluição ambiental e a recuperação do meio ambiente, por outro lado, um lado não tão positivo, devido a poderem apresentar efeitos tóxicos. Com isto, verifica-se que as mesmas propriedades que tornam os nanomateriais interessantes e atrativos, como o tamanho reduzido da partícula, a sua forma diferenciada e a grande área de superfície, podem por outro lado ser os responsáveis pelos efeitos tóxicos (Paschoalino et al., 2010).

A nanotoxicologia é um novo ramo de conhecimento que está em evolução e em fase de consolidação. Os estudos nanotoxicológicos antes de 2008 mostram-se inutilizáveis mas a partir desse mesmo ano têm sido otimizados, sendo que a partir de

2012, a caracterização dos nanomateriais está melhor definida, padronizada e reconhecida internacionalmente (Johnston et al., 2013). As interações com o meio ambiente não são analisadas o suficiente, o que deverá daqui em diante construir uma atenção especial pois a toxicidade estabelece-se e assim poderá ser medida, a partir de interações, e uma delas é com o meio ambiente, ou seja, os nanomateriais fabricados por ação humana têm um comportamento no laboratório e outro quando em contacto com o ser humano. Outro aspecto a ter em atenção é a reação das nanopartículas já existentes na natureza e a maneira como interagem com o ser humano (Jing Wang et al., 2011).

Há variados tópicos relacionados com o tema nanoambiente, que poderão ser muito interessantes e uteis para minimizar a crise ambiental e melhorar a qualidade do meio ambiente. São de realçar os sensores nanoestruturados para a detecção e quantificação de pesticidas, nutrientes e metais, os biossensores baseados em enzimas e material genético para detecção e quantificação de contaminantes ou nutrientes orgânicos de origem agrícola e também os nanomateriais bioativos para controlo e eliminação de contaminação microbiana, nanodispositivos para tratamentos de água e resíduos, técnicas e sensores para detecção, diagnóstico de partículas em alimentos, no meio ambiente e em seres vivos, entre outras (Elsaesser & Howard, 2012; Lewinski et al., 2008).

3.2 - Avaliação da toxicidade de nanomateriais

A avaliação da toxicidade de nanomateriais é feita através de estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

3.2.1 - Toxicidade *in vitro*

Os estudos de toxicidade *in vitro* são efectuados para estabelecer o direccionamento dos testes de toxicidade *in vivo*, mas em relação às nanopartículas esses testes estão a ser realizados simultaneamente por vários investigadores. A cultura de células é uma alternativa para a toxicidade sistemática das nanopartículas *in vitro*, com a utilização de várias células com características próprias cada.

Existem vários efeitos possíveis causados por nanomateriais no ser humano, como se pode ver na tabela 1:

Tabela 1- Possíveis efeitos fisiopatológicos de nanopartículas (Adaptada de: Nel et al., 2006).

Efeitos de nanopartículas	Efeitos fisiopatológicos
Geração de espécies reativas de oxigénio	Danos em proteínas, DNA e membranas (stress oxidativo)
Stress oxidativo	Inflamação e distúrbio mitocondrial
Distúrbio mitocondrial	Danos na membrana interna, mudanças na permeabilidade
Inflamação	Infiltração de células inflamatórias nos tecidos, fibrose, granulomas
Captura pelo sistema retículo endotelial	Capturas assintomáticas do fígado e baço, possibilidade de aumento de órgão ou disfunção
Desnaturação e degradação de proteínas	Perda de actividade enzimática e auto-antigenicidade
Captura pelo núcleo	Danos no DNA, agregação de proteínas nucleares
Distúrbio na função dos fagócitos	Inflamação crónica, fibrose, granulomas, interferência na eliminação de agentes infecciosos
Disfunção no sistema endotelial	Trombose, AVC
Geração de neoantígenos	Autoimunidade
Alterações na regulação do ciclo celular	Proliferação celular
Danos no DNA	Mutagénese, metaplasia, carcinogénese

3.2.2 - Toxicidade *in vivo*

Os estudos de toxicidade *in vivo* são onerosos, demorados e envolvem questões éticas com o uso de animais. Devido a isso, os testes de toxicidade *in vitro* têm sido utilizados com mais frequência para a maioria dos investigadores que trabalham com nanomateriais. Isso é devido ao facto dos ensaios *in vitro* serem mais rápidos, convenientes e menos dispendiosos e acima de tudo não envolvem quaisquer questões éticas. No entanto, vários factores como os efeitos hormonais não são encontrados em culturas celulares, sendo que além disso, o estudo de efeitos crónicos de uma substância não é possível sem que se recorra a estudos *in vivo* (Dhawan & Sharma, 2010).

O uso de nanopartículas na área biomédica tem crescido nos últimos anos, levando a campos novos como o campo de diagnóstico e tratamento. Esses campos envolvem a administração de nanopartículas em sistemas biológicos. Para a futura utilização das nanopartículas nestes campos, é possível iniciar a avaliação através da análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos (Lasagna-Reeves et al., 2010).

Certos parâmetros hematológicos são frequentemente utilizados como marcadores na avaliação da função hepática e renal (Zhang et al., 2010).

A toxicidade renal pode ser determinada através dos níveis de ureia e creatinina no sangue, que são metabolitos associados com a funcionalidade dos rins (Lasagna-Reeves et al., 2010).

3.3 - Efeitos das nanopartículas

A figura 17 demonstra um resumo dos possíveis efeitos adversos à saúde, realçando as rotas das nanopartículas no organismo, órgãos afetados e as doenças associadas. Nem todas as nanopartículas produzem tais efeitos, devido à toxicidade depender de vários factores como o tamanho, composição e outras características químicas ou físicas.

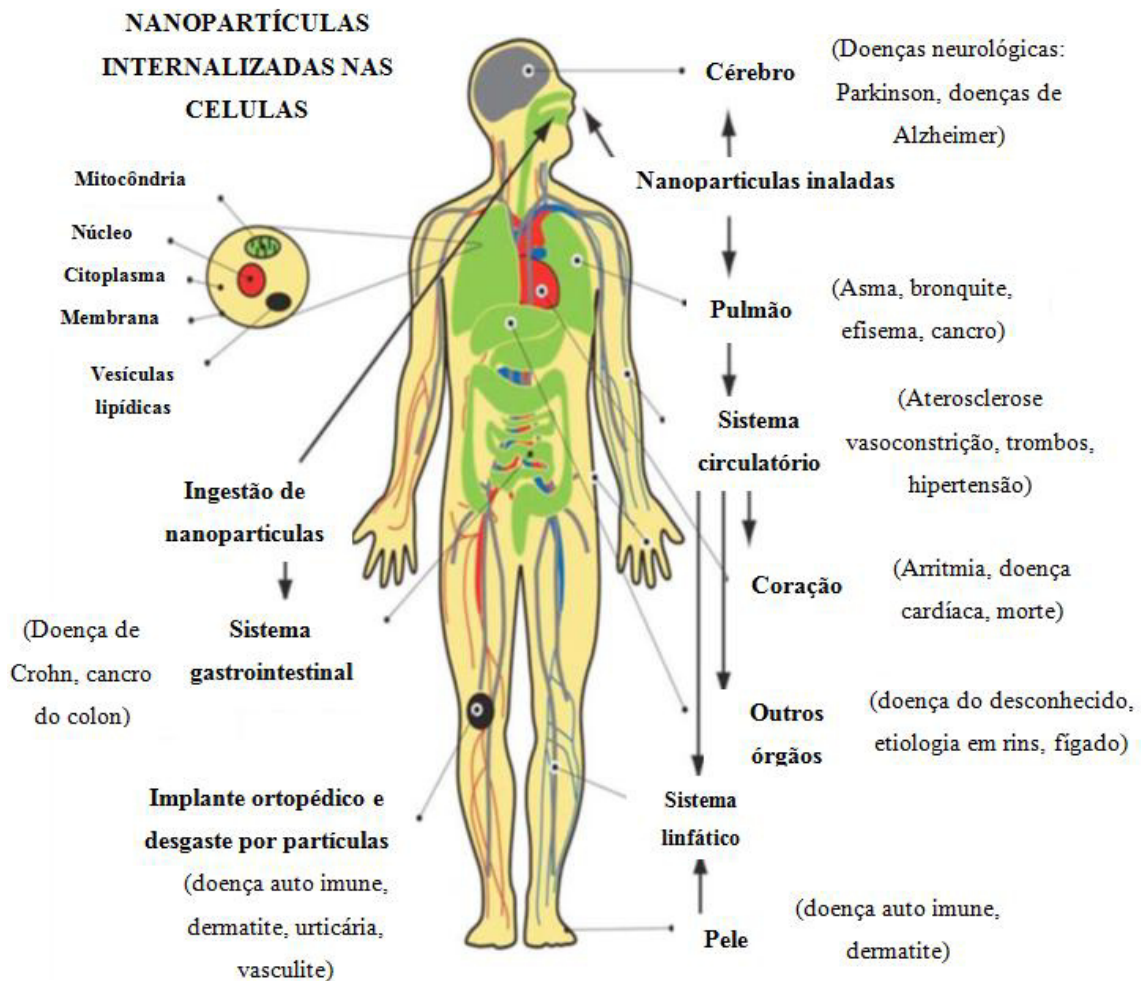


Figura 17 - Corpo humano e as vias de exposição às nanopartículas, órgãos afetados pelas mesmas, e doenças associadas a partir de estudos in vivo e in vitro (adaptada de: Buzea et al., 2007).

Capítulo 4 - Exemplo de estudo de avaliação de nanotoxicidade

4.1 - Estudo relativo a nanopartículas de TiO₂ e ácido fosfotúngstico (HPW)

4.1.1 - Caracterização das nanopartículas de TiO₂

Através de uma suspensão de nanopartículas de TiO₂ 10% em água desionizada com pH 7,9 fez-se todos os ensaios de toxicidade. Todas as nanopartículas continham uma mistura de anatase e rutila (duas das três formas minerais do TiO₂), com partículas de diâmetro médio de 50nm (A. H. Silva, 2011).

4.2 - Avaliação da toxicidade *in vitro*

4.2.1 - Ensaios de citotoxicidade das nanopartículas

O número de nanopartículas de TiO₂ tem vindo a aumentar devido ao aumento de produção de inúmeros produtos disponíveis comercialmente e assim, os estudos *in vitro* e *in vivo* que avaliam os riscos destas nanopartículas têm tido um grande aumento na investigação e preocupação nos últimos anos (Drobne, Jemec, & Tkalec, 2009; Goncalves, Chiasson, & Girard, 2010; Park et al., 2008; Zhu et al., 2009).

Os estudos toxicológicos *in vitro* são utilizados frequentemente no rastreamento de possíveis efeitos biológicos antes dos ensaios *in vivo*, ocorrendo assim uma diminuição da utilização de animais (Monteiro-Riviere, Inman, & Zhang, 2009).

Os ensaios realizados foram iguais para ambas as substâncias em linhagens de Vero (originária do rim do macaco *Cercopithecus aethiops*) e MDCK (linhagem de fibroblasto canino) através do método MTT (método que avalia a actividade metabólica das células quantificando a redução metabólica) (Nicolau, Dias, Carvalho, Mota, & Lima, 1999). Nos ensaios iniciais foi possível ver que o TiO₂ se depositava no fundo da placa, o que poderia levar ao impedimento de crescimento das células. Devido

ao HPW ser um ácido muito forte, verificou-se cuidadosamente o pH do meio de cultura para que as variações de pH não interferissem com o crescimento das células (A. H. Silva, 2011).

Nas linhagens celulares testadas, as nanopartículas de TiO_2 não parecem ser citotóxicas em nenhum dos ensaios de viabilidade. Em ambos os ensaios verificou-se um aumento na viabilidade celular (Figura 18) (A. H. Silva, 2011). Outros ensaios foram realizados no estudo para confirmar vários estudos que já tinham demonstrado a citotoxicidade de nanopartículas de TiO_2 *in vitro* (Goncalves et al., 2010; Shi, Wang, He, Yadav, & Wang, 2010).

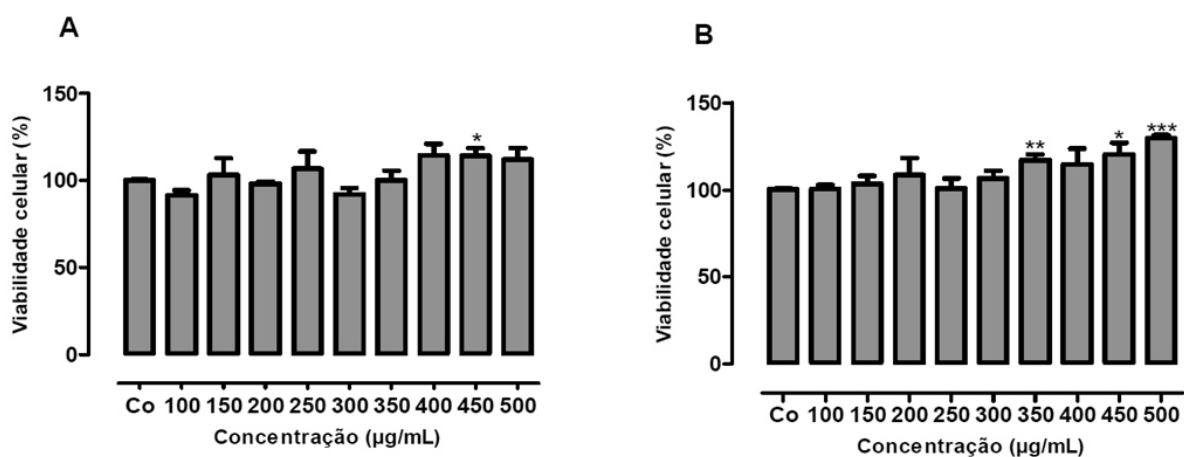


Figura 18 - Citotoxicidade de nanopartículas de TiO_2 em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B) pelo método MTT. As células foram incubadas com concentrações de 0 a 500 $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas, por 24 horas. (adaptada de: A. H. Silva, 2011).

O HPW mostrou ser citotóxico pelo método MTT, na linhagem Vero, a partir da concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 19). Estes resultados sugerem que esta substância interfere no metabolismo mitocondrial e na actividade lisossomal das células (A. H. Silva, 2011).

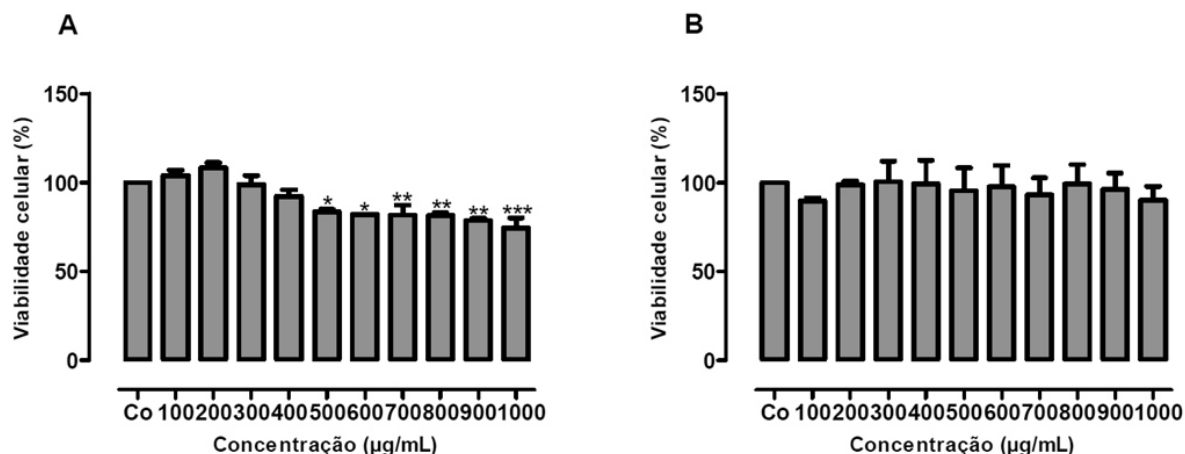


Figura 19 - Citotoxicidade do HPW em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B) pelo método MTT. As células foram incubadas com concentrações de 0 a 1000 µg/mL do ácido, durante 24 horas. (adaptada de: A. H. Silva, 2011).

4.2.1.1 - Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio

A produção de EROs (espécies reativas de oxigênio) é um dos mecanismos de toxicidade das nanopartículas de TiO₂, sendo que já existem evidências de vários problemas relacionados com a exposição a este tipo de nanopartículas como inflamação pulmonar, problemas no fígado, rins e cérebro (Y. Li et al., 2010).

O método utilizado serviu para avaliar a presença de espécies reativas no interior da célula através da adição de acetato de diclorofluoresceína. (DCFH-DA) à célula. Esse composto é transformado no citoplasma em diclorofluoresceína reduzida (DCFH) pelas esterases, que na presença de espécies reativas de oxigênio, é oxidada em diclorofluoresceína (DCF) (A. H. Silva, 2011).

Observou-se um aumento na produção de EROs em ambas as linhagens celulares quando se utilizou 500 µg/mL da nanopartícula de TiO₂, observou-se um aumento apenas na linhagem MDCK quando se utilizou HPW (Figura 20). Num estudo feito por Sha e seus colaboradores verificaram que em quatro linhagens de células diferentes, apenas com 10 µg/mL de nanopartículas encontraram um aumento na geração de EROs (Sha, Gao, Wang, Xu, & Lu, 2011).

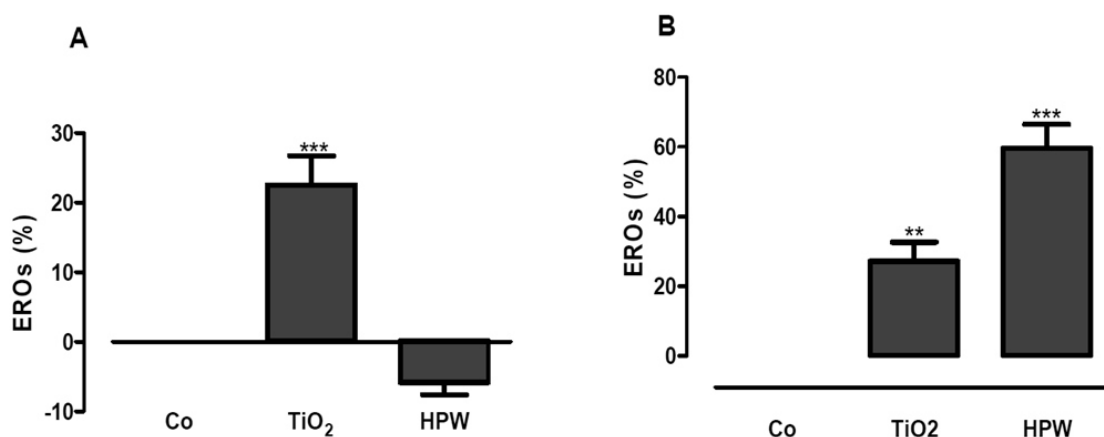


Figura 20 - Efeito das nanopartículas de TiO₂ e do HPW na produção de EROs em linhagem celular Vero (A) e MDCK (B). Foi determinado através da sonda DCFH-DA, conforme descrito anteriormente. As células foram incubadas com 500 µg/mL das nanopartículas e 1000 µg/mL das nanopartículas e 1000 µg/mL de HPW durante 24 horas (adaptada de: A. H. Silva, 2011).

Observou-se alguma citotoxicidade nas partículas de TiO₂ e HPW apesar de se ter utilizado no estudo uma alta concentração, isto porque noutros estudos anteriores como o exemplo do estudo feito por Sha e seus colaboradores em que apenas utilizaram concentrações a partir de 0,1 µg/mL e em quatro diferentes linhagens celulares observou alguma citotoxicidade (Sha et al., 2011). Neste estudo observou-se que uma concentração abaixo de 100 µg/mL tanto para as nanopartículas como para o HPW não apresentaram efeito citotóxico para as linhagens estudadas (A. H. Silva, 2011).

Mesmo com a diferença no que diz respeito à composição química, atribui-se anteriormente a diferença de citotoxicidade originada pelas nanopartículas de TiO₂ devido à diferença no tamanho. Noutro estudo feito anteriormente em ratos, demonstraram que as nanopartículas com tamanho perto de 20nm têm a capacidade de originar uma resposta inflamatória pulmonar maior do que nanopartículas com tamanho de 250nm (Baggs, Ferin, & Oberdorster, 1997).

Deveria utilizar-se mais do que um ensaio de viabilidade celular, e mais do que uma linhagem celular, devido às nanopartículas poderem exercer toxicidade por vários mecanismos diferentes.

4.3 - Avaliação da toxicidade *in vivo*

Na avaliação da toxicidade *in vivo*, os parâmetros utilizados foram os mesmos. Iniciou-se com uma pesagem dos animais após o tratamento com as nanopartículas de TiO₂ (Tabela 2), e verificou-se que houve uma variação pequena no peso dos animais tratados com nanopartículas de TiO₂ (A. H. Silva, 2011).

Tabela 2 - Variação do peso corporal após tratamento com nanopartículas de TiO₂ (adaptada de: A. H. Silva, 2011).

Parâmetros	Animal controle	Animal tratado com TiO ₂
Variação do peso (g)	3,5 ± 0,5	1,16 ± 0,99

No estudo efetuado foi possível observar um acúmulo de nanopartículas de TiO₂ na cavidade peritoneal, destacando-se mais perto do fígado e estômago (Figura 21)



Figura 21- Nanopartículas de TiO₂ acumuladas perto do fígado e estômago (retirada de: A. H. Silva, 2011).

Os resultados obtidos neste estudo, assim como a variação de peso nos animais tratados com nanopartículas de TiO_2 estão de acordo com um estudo realizado anteriormente por Chen e os seus colaboradores. Nesse estudo foram utilizados macacos em que foram tratados com nanopartículas de TiO_2 e posteriormente também encontraram uma grande área na cavidade peritoneal com nanopartículas depositadas, mais precisamente perto do fígado e intestino. A morte dos animais foi justificada pela grande quantidade de nanopartículas acumuladas na cavidade peritoneal dos mesmos (J. Chen, Dong, Zhao, & Tang, 2009).

Posteriormente também foram pesados os órgãos dos animais (Tabela 3), e verifica-se que houve uma diferença no que diz respeito ao peso do baço (observou-se um aumento) e rins (observou-se uma diminuição) dos animais tratados com nanopartículas de TiO_2 . O aumento do peso do baço pode ser explicado por alterações causadas pelas nanopartículas como a diminuição de hemácias, hemoglobina, hematócritos, leucócitos, entre outros. (Tabela 4) (A. H. Silva, 2011).

Tabela 3 - Peso dos órgãos dos animais (adaptada de: (A. H. Silva, 2011)).

Parâmetros	Animal controle	Animal tratado com TiO_2
Baço	$0,182 \pm 0,012$	$0,285 \pm 0,008$
Cérebro	$0,374 \pm 0,021$	$0,365 \pm 0,009$
Estômago	$0,373 \pm 0,008$	$0,357 \pm 0,027$
Pulmão	$0,254 \pm 0,019$	$0,264 \pm 0,011$
Fígado	$2,052 \pm 0,139$	$2,149 \pm 0,061$
Coração	$0,207 \pm 0,023$	$0,186 \pm 0,011$
Rins	$0,252 \pm 0,021$	$0,211 \pm 0,011$

Tabela 4 - Parâmetros hematológicos dos animais (adaptada de: (A. H. Silva, 2011).

Parâmetros	Animal controle	Animal tratado com TiO ₂
Hemácias (/mm ³)	5.937.000 ± 457	4.833.000 ± 255
Leucócitos (/mm ³)	7.691 ± 689	3.758 ± 236
Volume corpuscular médio (fL)	71 ± 3	66 ± 2
Hemoglobina corpuscular média (pg)	23 ± 3	20 ± 1
Concentração da hemoglobina corpuscular (%)	31 ± 2	31 ± 1
Hemoglobina (g/dL)	14 ± 2	10 ± 2
Hematócrito (%)	43 ± 2	32 ± 3
Neutrófilos (%)	14.51 ± 2.13	17 ± 2
Mononuclear (%)	85.66 ± 3.07	74 ± 2
Eosinófilos (%)	1 ± 1	1 ± 1
Basófilos (%)	2.5 ± 1	9 ± 1

Outro parâmetro em que se observou uma diminuição foram os níveis séricos de colesterol e triglicéridos nos animais tratados com nanopartículas de TiO₂. Também se observou uma alteração nos níveis séricos da enzima aspartato aminotransferase (AST). (Tabela 5). Noutro estudo anterior em 2009, já se tinham encontrado um aumento nas enzimas AST e alanina aminotransferase (ALT) em ratos tratados com TiO₂, assim

como outros estudos (2007) que encontraram deposição de nanopartículas no fígado, levando a dano hepático (F. Wang et al., 2009; Jiangxue Wang et al., 2007).

Tabela 5 - Parâmetros bioquímicos dos animais (adaptada de: A. H. Silva, 2011).

Parâmetros	Animal controle	Animal tratado com TiO ₂
ALT (UI/L)	111 ± 9	119 ± 9,2
AST (UI/L)	101 ± 10	140 ± 7,19
Albumina (g/dL)	2,30 ± 0,05	2,30 ± 0,077
Proteínas totais (g/dL)	5,07 ± 0,19	5,2 ± 0,347
Ureia (mg/dL)	62 ± 5	47 ± 2,23
Creatinina (mg/dL)	0,48 ± 0,08	0,47 ± 0,013
Triglicéridos (mg/dL)	97 ± 19	48 ± 5,75
Colesterol total (mg/dL)	91 ± 12	76 ± 7,55

Através do estudo *in vivo* for demonstrado que as nanopartículas de TiO₂ causam alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, que levam ao dano hepático.

Conclusão

A nanotecnologia é uma área promissora e que tem mostrado resultados surpreendentes e inovadores. Já se encontra introduzida na nossa sociedade na mais variada forma. No entanto, para que tudo seja um sucesso, é necessário que o estudo da nanotoxicologia seja aprofundado.

Existe uma grande variedade de nanopartículas atualmente, com variadas aplicações e com diversos objetivos. A área dos nanomateriais torna-se assim bastante interessante, devido a conseguir ir além do suposto “normal”, por exemplo, no que diz respeito à saúde, consegue-se devido às pequenas dimensões das partículas, incidir mais no foco da célula viral e assim conseguir combatê-la.

Por ser uma área em grande expansão atualmente, torna as questões toxicológicas sem serem totalmente esclarecidas, isto porque apesar das nanopartículas serem consideradas seguras, não deixam de ser corpos estranhos ao organismo.

Nesta monografia foi demonstrado um estudo elaborado com nanopartículas de TiO_2 e ácido fosfotúngstico. Através dos ensaios de viabilidade *in vitro* MTT, as nanopartículas de TiO_2 não mostraram ser citotóxicas nas linhagens celulares apresentadas, mas por outro lado, o ácido fosfotúngstico mostrou-se citotóxico em ambas as linhagens celulares.

Através do ensaio de viabilidade *in vivo* das nanopartículas de TiO_2 , após se terem morto os animais, foi possível observar-se nanopartículas depositadas em toda a cavidade peritoneal, podendo estar relacionado com o menor ganho de peso dos animais tratados quando comparados com os animais controlo. Também foi possível verificar que essas nanopartículas causam alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, o que leva a possíveis danos no baço e fígado.

Assim, conclui-se que esta área dos “nano” (materiais) é, ao contrário de como o nome indica, uma “grande” área e bastante interessante, mas ainda em constante desenvolvimento e com algumas, mas poucas certezas ainda, dos problemas toxicológicos e risco que possam ser causados pela utilização dos mesmos.

Bibliografia

- Aruoja, V., Dubourguier, H.-C., Kasemets, K., & Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of The Total Environment*, 407(4), 1461–1468.
- Auffan, M., Decome, L., Rose, J., Orsiere, T., De Meo, M., Briois, V., ... Bottero, J. Y. (2006). In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxic study. *Environ. Sci. Technol*, 40, 4367–4373.
- Baggs, R. B., Ferin, J., & Oberdorster, G. (1997). Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Vet. Pathol.*, 34(6), 592–597.
- Batista, C. M., Carvalho, C. M. B. De, & Magalhães, N. S. S. (2007). Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(2), 167–179. <http://doi.org/10.1590/S1516-93322007000200003>
- Bharali, D. J., Bharali, D. J., Khalil, M., Khalil, M., Gurbuz, M., Gurbuz, M., ... Mousa, S. a. (2009). Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on dendrimers. *International Journal of Nanomedicine*, 4, 1–7. <http://doi.org/10.2147/IJN.S4241>
- Bhol, K. C., & Schechter, P. J. (2007). Effects of nanocrystalline silver (NPI 32101) in a rat model of ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 52(10), 2732–2742.
- Biroi, H., Rambo, C. R., Guiotoku, M., & Hotza, D. (2013). Preparation of ceramic nanoparticles via cellulose-assisted glycine nitrate process: a review. *RSC Advances*, 3(9), 2873–2884.
- Bleve, M., Pavanetto, F., & Perugini, P. (2011). Solid Lipid Nanoparticles: Technological Developments and in Vivo Techniques to Evaluate Their Interaction with the Skin. ... and Modeling to Technology Retrieved from http://www.intechopen.com/source/pdfs/17240/InTech-Solid_lipid_nanoparticles_technological_developments_and_in_vivo_techniques_to_evaluate_their_interaction_with_the_skin.pdf
- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17–R71. <http://doi.org/10.1116/1.2815690>
- Cedervall, T., Lynch, I., Lindman, S., Berggård, T., Thulin, E., Nilsson, H., ... Linse, S. (2007). Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2050–2055. <http://doi.org/10.1073/pnas.0608582104>

- Chan, J. M., Valencia, P. M., Zhang, L., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2010). Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. *Cancer Nanotechnology*, 624, 163–175.
- Chen, J., Dong, X., Zhao, J., & Tang, G. (2009). *In vivo* acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. *Journal of Applied Toxicology*, 29(4), 330–337. <http://doi.org/10.1002/jat.1414>
- Chen, X., & Dobson, P. J. (2012). Synthesis of Semiconductor Nanoparticles. *Nanoparticles in Biology and Medicine*, 906, 103–123.
- Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z., & Shin, D. M. (2008). Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1310–1316. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1441>
- Choi, H. S., Liu, W., Liu, F., Nasr, K., Misra, P., Bawendi, M. G., & Frangioni, J. V. (2010). Design considerations for tumour-targeted nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 5(1), 42–47. <http://doi.org/10.1038/nnano.2009.314>
- Curl, R., Smalley, R., & Fuller, R. B. (1996). The discovery of buckminsterfullerene.
- Davies, J. C. (2007). EPA AND NANOTECHNOLOGY : OVERSIGHT for THE 21st CENTURY. *Current*, (May).
- De Souza Filho, A. G., & Fagan, S. B. (2007). Funcionalização de nanotubos de carbono. *Química Nova*, 30(7), 1695–1703. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422007000700037>
- Delgado, I. F., & Paumgartten, F. J. R. (2013). Desafios atuais da pesquisa em toxicologia: Avaliação da toxicidade de nanomateriais manufaturados para o desenvolvimento. *Vigilância Sanitária Em Debate*, 1(4). <http://doi.org/10.3395/vd.v1i4.114pt>
- Dhawan, A., & Sharma, V. (2010). Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), 589–605.
- Drobne, D., Jemec, A., & Tkalec, Z. P. (2009). In vivo screening to determine hazards of nanoparticles: Nanosized TiO₂. *Environmental Pollution*, 157(4), 1157–1164.
- Duncan, R., & Gaspar, R. (2011). Nanomedicine(s) under the Microscope. *Molecular Pharmaceutics*, 8, 2101–2141.
- Edwards, K. A., & Baeumner, A. J. (2006). Liposomes in analyses. *Talanta*, 68(5), 1421–1431.
- Elsaesser, A., & Howard, C. V. (2012). Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(2), 129–137. <http://doi.org/10.1016/j.addr.2011.09.001>
- Fadeel, B., & Garcia-Bennett, A. E. (2010). Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical

- applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(3), 362–374.
<http://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.008>
- Fattal, E., & Vouthier, C. (2002). Nanoparticles as drug delivery systems. In *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (pp. 1864–1882).
- Federici, G., Shaw, B. J., & Handy, R. D. (2007). Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 84(4), 415–430.
<http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>
- Forbe, T., García, M., & Gonzalez, E. (2011). Potencial risks of nanoparticles Riscos potenciais do nanopartículas. *Ciência E Tecnologia de ALimentos*, 31(4), 835–842.
<http://doi.org/10.1590/S0101-20612011000400002>
- Fraser, E. D. G., Dougill, A. J., Mabey, W. E., Reed, M., & McAlpine, P. (2006). Bottom up and top down: Analysis of participatory processes for sustainability indicator identification as a pathway to community empowerment and sustainable environmental management. *Journal of Environmental Management*, 78(2), 114–127. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.04.009>
- Giri, S., Trewyn, B. G., & Lin, V. S. Y. (2007). Mesoporous silica nanomaterial-based biotechnological and biomedical delivery systems. *Nanomedicine*, 2, 99–111.
- Goncalves, D. M., Chiasson, S., & Girard, D. (2010). Activation of human neutrophils by titanium dioxide (TiO₂). *Toxicology in Vitro*, 24(3), 1002–1008.
- Grieve, K., Mulvaney, P., & Grieser, F. (2000). Synthesis and electronic properties of semiconductor nanoparticles/quantum dots. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5(1-2), 168–172.
- Grobmyer, S. R., Morse, D. L., Fletcher, B., Gutwein, L. G., Sharma, P., Krishna, V., ... Brown, S. C. (2011). The promise of nanotechnology for solving clinical problems in breast cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 103(4), 317–325.
- Huertas, C. M., Mora, C., & Obtention, H. (2011). a base de polym`eres : etude fondamentale et application au d´eveloppement de nanocapsules `a usage p´ediatrique.
- Hund-Rinke, K., & Simon, M. (2006). Ecotoxic Effect of Photocatalytic Active Nanoparticles (TiO₂) on Algae and Daphnids (8 pp). *Environmental Science and Pollution Research*, 13(4), 225–232.
- Husseini, G. A., & Pitt, W. G. (2008). Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(10), 1137–1152.
- Jahanshahi, M., & Babaei, Z. (2008). Protein nanoparticle : A unique system as drug delivery vehicles. *Journal of Biotechnology*, 7(25), 4926–4934.
<http://doi.org/10.4314/ajb.v7i25.59701>

- Johnston, H., Pojana, G., Zuin, S., Jacobsen, N. R., Moller, P., Loft, S., ... Stone, V. (2013). Engineered nanomaterial risk. Lessons learnt from completed nanotoxicology studies: potential solutions to current and future challenges. *Critical Reviews in Toxicology*, 43(1), 1–20.
- Kanlayavattanakul, M., & Lourith, N. (2011). Therapeutic agents and herbs in topical application for acne treatment. *International Journal of Cosmetic Science*, 33(4), 289–297. <http://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2011.00647.x>
- Klostranec, J. M., & Chan, W. C. W. (2006). Quantum Dots in Biological and Biomedical Research: Recent Progress and Present Challenges. *Advanced Materials*, 18(15), 1953–1964.
- Kolishetti, N., Dhar, S., Valencia, P. M., Lin, L. Q., Karnik, R., Lippard, S. J., ... Farokhzad, O. C. (2010). Engineering of self-assembled nanoparticle platform for precisely controlled combination drug therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), 17939–17944. <http://doi.org/10.1073/pnas.1011368107>
- Lasagna-Reeves, C., Gonzalez-Romero, D., Barria, M. A., Olmedo, I., Clos, A., Sadagopa Ramanujam, V. M., ... Soto, C. (2010). Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 649–655.
- Lewinski, N., Colvin, V., & Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 4(1), 26–49. <http://doi.org/10.1002/smll.200700595>
- Li, C., & Chou, T.-C. (2003). A structural mechanics approach for the analysis of carbon nanotubes. *International Journal of Solids and Structures*, 40(10), 2487–2499.
- Li, Y., Li, J., Yin, J., Li, W., Kang, C., Huang, Q., & Li, Q. (2010). Systematic influence induced by 3 nm titanium dioxide following intratracheal instillation of mice. *Journal Nanoscience Nanotechnology*, 10(12), 8544–8549.
- Liu, J., & Lu, Y. (2005). Fast colorimetric sensing of adenosine and cocaine based on a general sensor design involving aptamers and nanoparticles. *Angewandte Chemie - International Edition*, 45(1), 90–94. <http://doi.org/10.1002/anie.200502589>
- Louro, H., Borges, T., & Silva, M. J. (2013). Nanomateriais manufacturados: novos desafios para a saúde pública. *Revista Portuguesa de Saude Publica*, 31(2), 145–157. <http://doi.org/10.1016/j.rpsp.2012.12.004>
- Martinho, N., Damgé, C., & Reis, C. P. (2011). Recent Advances in Drug Delivery Systems. *Journal of Biomaterials and Nanotechnology*, 510–526.
- Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., & Graves, S. M. (2006). Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(41), R635–R666. <http://doi.org/10.1088/0953-8984/18/41/R01>

- Melo, M. A., Santos, L. S. S., Do Carmo Gonçalves, M., & Nogueira, A. F. (2012). Preparação de nanopartículas de prata e ouro: Um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. *Química Nova*, 35(9), 1872–1878. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422012000900030>
- Melo, S., Cunha, S., & Fialho, S. L. (2012). Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos, 33(4), 469–477.
- Moghimi, S. M., Hunter, a C., & Murray, J. C. (2005). Nanomedicine: current status and future prospects. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(3), 311–330. <http://doi.org/10.1096/fj.04-2747rev>
- Montanari, M. L. C., & Alberto, C. (1998). Sistemas transportadores de drogas, 21(4), 470–476.
- Monteiro-Riviere, N. A., Inman, A. O., & Zhang, L. W. (2009). Limitations and relative utility of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234(2), 222–235.
- Moore, M. N. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, 32(8), 967–976. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2006.06.014>
- Moreno-Vega, A. I., Gómez-Quintero, T., Nuñez-Anita, R. E., Acosta-Torres, L. S., & Castaño, V. (2012). Polymeric and ceramic nanoparticles in biomedical applications. *Journal of Nanotechnology*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/936041>
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761), 622–627.
- Nicolau, Dias, N., Carvalho, G. S., Mota, M., & Lima, N. (1999). OS PROTOZOÁRIOS COMO FERRAMENTA DA MONITORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DA POLUIÇÃO: ENSAIOS IN VITRO, 1–10.
- Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., ... Yang, H. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology*, 2, 8. <http://doi.org/10.1186/1743-8977-2-8>
- Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., Wen, F., Simon, U., ... Jähnen-Dechent, W. (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*, 3(11), 1941–1949. <http://doi.org/10.1002/smll.200700378>
- Park, E.-J., Yi, J., Chung, K.-H., Ryu, D.-Y., Choi, J., & Park, K. (2008). Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology Letters*, 180(3), 222–229.

- Paschoalino, M. P., Marcone, G. P. S., & Jardim, W. F. (2010). Os nanomateriais e a questão ambiental. *Química Nova*, 33(2), 421–430. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422010000200033>
- Raj, S., Jose, S., Sumod, U. S., & Sabitha, M. (2012). Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*, 4 (3), 186–193.
- Rajabi, S., Ramazani, A., Hamidi, M., & Naji, T. (2015). Artemia salina as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 1–6. <http://doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x>
- Ranganathan, R., Madanmohan, S., Kesavan, A., Baskar, G., Krishnamoorthy, Y. R., Santosham, R., ... Venkatraman, G. (2012). Nanomedicine: Towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1043–1060. <http://doi.org/10.2147/IJN.S25182>
- Reis, A. C. B. P. (2011). Micro e Nanopartículas Biomacromoleculares (Polissacarídicas, Proteicas e Peptídicas). *Novas Formas Farmacêuticas Para Administração de Fármacos*, Ed. Eliana Souto - Universidade Fernando Pessoa, 199–236.
- Rezende, S., Stanisçuaski, S., Lucca, L. De, & Raffin, A. (2003). Revisão, 26(5), 726–737.
- Santos, L. J. Dos, Rocha, G. P., Alves, R. B., & Freitas, R. P. De. (2010). Fulereno[C60]: química e aplicações. *Química Nova*, 33(3), 680–693. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300036>
- Sayes, C. M., Reed, K. L., & Warheit, D. B. (2007). Assessing toxicology of fine and nanoparticles: Comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicological Sciences*, 97(1), 163–180. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfm018>
- Schaffazick, S. R., & Pohlmann, A. R. (2002). Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanopartículas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. *Acta Farm. Bonaerense*, 21(2), 99–106.
- Service, R. F. (2004). Nanotechnology Grows Up. *Science*, 304, 1732–1734.
- Sha, B., Gao, W., Wang, S., Xu, F., & Lu, T. (2011). Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles Differs in Four Liver Cells from Human and Rat. *Composites Part B: Engineering*, 42(8), 2136–2144.
- Shi, Y., Wang, F., He, J., Yadav, S., & Wang, H. (2010). Titanium dioxide nanoparticles cause apoptosis in BEAS-2B cells through the caspase 8/t-Bid-independent mitochondrial pathway. *Toxicology Letters*, 196(1), 21–27.

- Shin, J., & Abraham, S. (2001). Caveolae--Not Just Craters in the Cellular Landscape. *Science*, 293, 1447–1448.
- Silva, A. H. (2011). *ESTRATÉGIAS PARA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS*.
- Silva, L. H., Viana, A. R., Baldissera, M. D., Nascimento, K., Sagrillo, M. R., & Luchese, C. (2014). REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE RELAÇÕES ENTRE NANOMATERIAIS , LITERATURE REVIEW ON RELATIONSHIP BETWEEN NANOMATERIALS ., *Disciplinarum Scientia*, 15(1), 19–30.
- Smith, C. J., Shaw, B. J., & Handy, R. D. (2007). Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 82(2), 94–109. <http://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.02.003>
- Souto, E. B., Severino, P., Santana, M. H. a, & Pinho, S. C. (2011). Nanopartículas de lipídios sólidos: Métodos clássicos de produção laboratorial. *Química Nova*, 34(10), 1762–1769. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422011001000009>
- Stroscio, J. a., & Kaiser, W. J. (1993). Scanning Tunneling Microscopy. *Methods of Experimental Physics*. <http://doi.org/10.1002/9780470661345.smc046>
- Svenson, S. (2009). Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3), 445–462.
- Tanaka, T., Decuzzi, P., Cristofanilli, M., Sakamoto, J. H., Tasciotti, E., Robertson, F. M., & Ferrari, M. (2008). Nanotechnology for breast cancer therapy. *Biomedical Microdevices*, 11(1), 49–63.
- Tong, L., Zhao, Y., Huff, T. B., Hansen, M. N., Wei, A., & Cheng, J.-X. (2007). Gold Nanorods Mediate Tumor Cell Death by Compromising Membrane Integrity. *Special Section on Bionanotechnology*, 19(20), 3136–3141.
- Vollath, D., Szabó, D. V., & Haubelt, J. (1997). Synthesis and properties of ceramic nanoparticles and nanocomposites. *Journal of the European Ceramic Society*, 17(11), 1317–1324.
- Wang, D., Du, X., & Zheng, W. (2008). Alteration of saliva and serum concentrations of manganese, copper, zinc, cadmium and lead among career welders. *Toxicology Letters*, 176(1), 40–47. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.10.003>
- Wang, F., Gao, F., Lan, M., Yuan, H., Huang, Y., & Liu, J. (2009). Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. *Toxicology in Vitro*, 23(5), 808–815.
- Wang, J., Asbach, C., Fissan, H., Hulser, T., Kuhlbusch, T. A. J., Thompson, D., & Pui, D. Y. H. (2011). How can nanobiotechnology oversight advance science and industry: examples from environmental, health, and safety studies of nanoparticles (nano-EHS). *J Nanopart Res*, 13, 1373–1387.

- Wang, J., Zhou, G., Chen, C., Yu, H., Wang, T., Ma, Y., ... Chai, Z. (2007). Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology Letters*, 168(2), 176–185.
- Weber, C., Coester, C., Kreuter, J., & Langer, K. (2000). Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 194(1), 91–102.
- Whatmore, R. W. (2006). Nanotechnology - What is it? Should we be worried? *Occupational Medicine*, 56(5), 295–299. <http://doi.org/10.1093/occmed/kql050>
- Yin, P., Wang, Y., Qiu, Y., Hou, L., Liu, X., Qin, J., ... Li, Q. (2012). Bufalin-loaded mPEG-PLGA-PLL-cRGD nanoparticles: preparation, cellular uptake, tissue distribution, and anticancer activity. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 3961–3969.
- Zhang, R., Niu, Y., Li, Y., Zhao, C., Song, B., Li, Y., & Zhou, Y. (2010). Acute toxicity study of the interaction between titanium dioxide nanoparticles and lead acetate in mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30(1), 52–60.
- Zhu, R. R., Wang, S. L., Chao, J., Shi, D. L., Zhang, R., Sun, X. Y., & Yao, S. D. (2009). Bio-effects of Nano-TiO₂ on DNA and cellular ultrastructure with different polymorph and size. *Materials Science and Engineering: C*, 29(3), 691–696.